

学校编码: 10384

分类号____密级____

学号: 21620111152472

UDC____

廈門大學

硕士学位论文

秀丽隐杆线虫 14-3-3 蛋白 PAR-5、AMPK
蛋白 AAK-2 对寿命及应激调控的研究

The 14-3-3 protein PAR-5 and AMPK homologous protein
AAK-2 regulate lifespan and stress response signaling in
Caenorhabditis elegans

姚玲艳

指导老师姓名: 王亚梅 副教授

专业名称: 细胞生物学

论文提交时间: 2014 年 4 月

论文答辩时间: 2014 年 5 月

学位授予时间: 2014 年 月

答辩委员会主席: _____

评阅人: _____

2014 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为()课题(组)的研究成果，获得()课题(组)经费或实验室的资助，在()实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

缩略词表

英文缩写	英文名称	中文名称
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
APS	ammonium persulfate	过硫酸铵
BSA	bovine serum albumin	牛血清白蛋白
CCD camera	Charge-Coupled Device Camera	电荷耦合元件 图像传感器
DIC	Differential Interference Contrast	微分干涉相差
DMSO	dimethyl sulfoxide	二甲亚砜
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
dNTP	deoxyribonucleoside triphosphate	脱氧核苷三磷酸
DTT	dithiothreitol	二硫苏糖醇
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	大肠杆菌
EB	ethidium bromide	溴化乙啶
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid	乙二胺四乙酸
FUDR	Floxuridine	氟脲嘧啶脱氧核苷
GFP	Green Fluorescent Protein	绿色荧光蛋白
IPTG	Isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranoside	异丙基- β -D-硫代 吡喃半乳糖苷
L1-L4	Larva 1-4	第一到第四期幼虫
L	liter	升, 体积单位
LB	Luria-Bertani culture medium	溶菌肉汤培养基
mL	milliliter	毫升, 体积单位
NGM	Nematode Growth Medium	线虫生长培养基
OD	optical density	光密度
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟

缩略词表

英文缩写	英文名称	中文名称
RNA	RiboNucleic Acid	核糖核酸
RNAi	RNA interference	RNA 干扰
SDS	sodium dodecyl sulfate	十二烷基磺酸钠
TE (Tris/EDTA)	Tris/EDTA	缓冲盐溶液
TEMED	N N N' N'-tetramethylethylenediamine	NNN'N'-四甲基二乙胺
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane	三羟基甲基氨基

目录

摘要.....	1
Abstract.....	2
前言.....	3
1 进化保守的参与寿命及应激调控信号通路在秀丽隐杆线虫中的研究进展	3
1.1 秀丽隐杆线虫生物学特征简介	3
1.2 秀丽隐杆线虫的作为模式生物的优点	4
1.3 利用秀丽隐杆线虫研究的进化保守的参与寿命及应激调控信号通路	5
1.3.1 胰岛素/胰岛素样生长因子信号通路.....	5
1.3.2 MAPK 信号通路.....	6
1.3.3 AMPK 相关的应激途径.....	8
2 AMPK 蛋白	9
2.1 AMPK 蛋白结构及在组织中的分布.....	9
2.2 AMPK 蛋白活性的调控.....	11
2.3 AMPK 蛋白的下游靶标及其生物学效应.....	11
3. 14-3-3 蛋白	14
3.1 14-3-3 蛋白家族特征	14
3.2 14-3-3 蛋白的调控机制与其活性调节	16
3.3 秀丽隐杆线虫中的 14-3-3 蛋白简介	18
4. 本文研究的目的及意义	18
第一章 秀丽隐杆线虫 14-3-3 蛋白 PAR-5 在神经系统对寿命调控机制	
的研究.....	20
1 材料与方法	20
1.1 材料	20
1.2 方法	23
2 结果与分析	31
2.1 神经系统表达 <i>par-5</i> 引起寿命延长与 JNK-1 相关性的研究	31
2.2 神经系统表达 <i>par-5</i> 引起寿命延长与 DAF-16 相关性的研究	34
3 讨论	36
第二章 秀丽隐杆线虫 AMPK 蛋白 AAK-2 对应激调控的研究	37
1 材料与方法	37
1.1 材料	37
1.2 方法	42
2 结果	48
2.1 不同压力条件对 AAK-2 亚细胞定位的影响分析	48
2.2 AAK-2 不同结构域对 AAK-2 亚细胞定位的影响分析	51
2.3 <i>aak-2</i> 突变对氧化压力的影响及 <i>aak-2</i> 基因不同亚型对 <i>aak-2</i> 突变体敏感	

性的拯救	54
2.4 不同压力条件下 AAK-2 蛋白水平的检测	57
2.5 AAK-2 与 14-3-3 蛋白的相互作用分析	59
2.6 分离压力条件下 AAK-2 的相互作用蛋白	62
3 讨论	64
结论与展望	66
参考文献	67
附录.....	73
致谢.....	75

Content

Abstract In Chinese.....	1
Abstract In English	2
Introduction	3
1. Progress of longevity and stress response regulation in <i>C. elegans</i>.....	3
1.1 Brief introduction of <i>C. elegans</i> biological characteristics.....	3
1.2 <i>C. elegans</i> is a good model for studying aging.....	4
1.3 The lifespan and stress regulation signaling pathways in <i>C. elegans</i>	5
1.3.1 Insulin / insulin-like growth factor signaling pathway.....	5
1.3.2 MAPK signaling pathway.....	6
1.3.3 AMPK-related stress response pathway.....	8
2. The studies of AMPK proteins.....	9
2.1 AMPK protein structure and tissue distribution.....	9
2.2 Regulation of AMPK protein activity.....	11
2.3 The downstream targets and biological effects of AMPK protein.....	11
3. The studies of 14-3-3 proteins	14
3.1 Brief introduction of 14-3-3 protein family.....	14
3.2 The regulatory mechanism by 14-3-3 proteins and the regulation of its activity.....	16
3.3 The studies of 14-3-3 proteins in <i>C. elegans</i>	18
4. Aims and significance of this dissertation.....	18
Chapter 1 The study on the mechanism of <i>C. elegans</i> lifespan regulation by 14-3-3 protein PAR-5 in nervous system.....	20
1.Materials and methods	20
2.Results and analyses	31
2.1 The study of the correlation between life extension by expressing <i>par-5</i> in nervous system and JNK-1	31
2.2 The study of the correlation between life extension by expressing <i>par-5</i> in nervous system and DAF-16.....	34
3.Discussion.....	36
Chapter 2 AMPK protein AAK-2 regulates stress response in <i>C. elegans</i>.....	37
1.Materials and methods	37
2.Results and analyses	48
2.1 Analyze the impact of different stress conditions on AAK-2 subcellular localization.....	48

2.2 Influence of different AAK-2 protein domains on AAK-2 subcellular localization.....	51
2.3 Effect of <i>aak-2</i> mutants on oxidative stress and rescuing effect of different <i>aak-2</i> isoforms on <i>aak-2</i> mutants.....	54
2.4 Detection of AAK-2 protein levels under different stress conditions	57
2.5 Analysis of the interaction between AAK-2 and 14-3-3 protein	59
2.6 Isolation of AAK-2-interacting proteins under stress conditions.....	62
3.Discussion.....	64
Conclusion and outlook	66
References.....	67
Appendixes	73
Acknowledgements.....	75

摘要

本文利用秀丽隐杆线虫研究了 14-3-3 蛋白 PAR-5 在神经系统过量表达延长寿命的调控机制，以及 AMPK 蛋白 AAK-2 对压力应激的调控，期望进一步加深对 14-3-3 蛋白、AMPK 两个保守的蛋白家族功能的认识。前期研究结果显示秀丽隐杆线虫中两个编码 14-3-3 蛋白的基因 *fit-2* 与 *par-5* 在多个组织中表达，过量表达两个基因都会延长线虫的寿命，但在神经系统只有过量表达 *par-5* 能显著延长个体的寿命。本文对转基因线虫寿命的分析显示，神经系统 PAR-5 对线虫寿命的延长作用不依赖于神经系统表达的寿命调控因子 JNK-1，而依赖于另一重要的寿命调控因子 DAF-16。AMPK 蛋白 AAK-2 在压力应激调控中起重要作用，*aak-2* 突变虫株对多种环境压力敏感。为了弄清 AAK-2 在压力应激中的作用机制，本文研究了在热激、饥饿条件下 AAK-2 的核质分布，AAK-2 不同蛋白结构域对其功能的影响，以及 AAK-2 在线虫应对压力时蛋白表达量的变化等。结果显示，AAK-2 是线虫应对热激、氧化压力的重要调控蛋白；AAK-2 可能不是通过改变其核质分布来应对压力的；AAK-2 不同的蛋白结构域对其核质分布具有不同的影响；在特定的压力条件下，如热激，线虫可能通过部分上调 AAK-2 蛋白表达量来应对压力。鉴于 14-3-3 和 AMPK 蛋白在进化上的保守性，本文的研究工作将有助于认识其他物种中 14-3-3 和 AMPK 蛋白在寿命及应激调控中的可能作用机制。

关键词：14-3-3 蛋白；AMPK；寿命；压力应激

Abstract

We used *C. elegans* in this paper to study the regulatory mechanism of 14-3-3 protein PAR-5 overexpression in the nervous system to extend life span, and the regulation of AMPK protein AAK-2 on stress response, in order to further understand the 14-3-3 and AMPK protein families. Previous studies showed that *ftt-2* and *par-5*, two *C. elegans* genes encoding 14-3-3 proteins, are widely expressed in many tissues and overexpressing both genes can extend life span, however, overexpressing only *par-5* but not *ftt-2* in nervous system can extend lifespan significantly. In present study, analyses of transgenic worms' life span showed that prolonged life span by overexpressing *par-5* in nervous system did not depend on lifespan regulator JNK-1 expressing in nervous system specifically, but on another important lifespan regulator DAF-16. AMPK protein AAK-2 plays an important role in the regulation of stress response, and *aak-2* mutants are sensitive to a variety of environmental stresses. In order to clarify the regulation mechanism of AAK-2 in stress response, we first studied the nucleo-cytoplasmic distribution of AAK-2 under heat shock and starvation conditions. We next examined the effect of different AAK-2 protein domains on its function. Finally we measured AAK-2 protein level under different stress conditions. Our results showed that AAK-2 is a key regulator of *C. elegans* response to heat shock and oxidative stress; AAK-2 may not change its nucleo-cytoplasmic distribution to cope with stress; different AAK-2 protein domains have different effects on its nucleo-cytoplasmic distribution; and worms might partially up-regulate AAK-2 protein level to cope with specific stress conditions, heat shock for example. Given 14-3-3 and AMPK proteins are highly conserved in evolution, the research work in this paper will help to understand the regulation mechanism of AMPK and 14-3-3 protein in life span and stress in other species.

Key word: 14-3-3 protein; AMPK; life span; stress response

前言

1 进化保守的参与寿命及应激调控信号通路在秀丽隐杆线虫中的研究进展

1.1 秀丽隐杆线虫生物学特征简介

秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*, 简称 *C. elegans*), 是一种可以独立生存的蠕虫, 体型微小, 成虫长度约 1.0-1.5 毫米^[1]。秀丽隐杆线虫生活在温度较为恒定的环境中, 以微生物为食, 它们对植物及人畜无害, 而且所需的饲养空间小、饲养成本低、后代数量多并易于操作。

秀丽隐杆线虫形态学特征为蠕虫状、两侧对称, 体表覆盖角质层。分为雌雄同体及雄性两种性别。雌雄同体一般自体繁殖, 也可以与雄性交配。在正常培养条件下产生的后代绝大部分为雌雄同体的自交后代, 雄虫比雌雄同体少一条性染色体, 雄虫产生的概率约为千分之一。

秀丽隐杆线虫的发育过程主要分为胚胎发育期、幼虫期 (L1—L4)、成虫期 (图 1 所示)。从受精卵到卵孵化的过程称为胚胎发育期, 卵在孵化后, 会经历四个幼虫期, 最后一次蜕皮后长成成虫。胚胎发育期结束后线虫进入 L1 期, L1 时期的线虫比成虫小很多, 但在生理结构上类似于成虫。如果环境状况不适合继续生长, 在 L2 幼虫期的末期, 秀丽隐杆线虫会进入另一种称为 dauer (滞育) 的幼虫期。形成 dauer 后虫体处于一种不会衰老的状态, 可在恶劣的环境条件下存活几个月之久; 若环境好转则开始进食脱离 dauer 期进入 L3 期。雌雄同体在 L4 期生产精子, 并在成虫期产卵。野生型秀丽隐杆线虫在 22℃ 食物充足的条件下, 平均寿命约为二、三周, 而从受精卵发育为成虫只需 3 天。

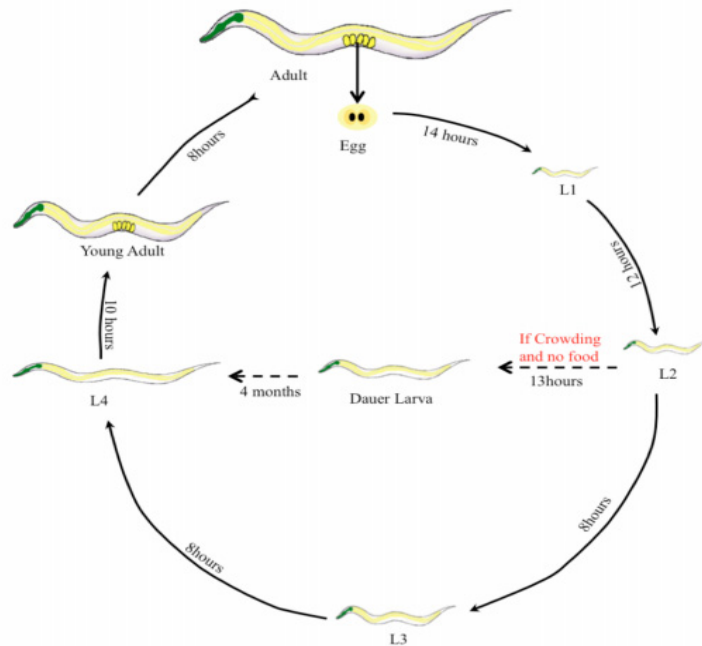


图 1 秀丽隐杆线虫在 22℃ 下的生命周期^[101]
Figure 1 *C. elegans* life cycle at 22℃

1.2 秀丽隐杆线虫作为模式生物的优点

秀丽隐杆线虫通体透明，便于观察。

生命周期短。依据实验要求可将秀丽隐杆线虫培养在 15、20 或 25℃，在 20℃ 条件下线虫生长状况最好，从受精卵发育到可产卵成虫，整个过程需要 3.5 天，一条繁殖期成虫大约能产三百多个后代。25℃ 条件下卵发育到成虫缩短为 2.5 天。发育时间短，后代数量多，非常适合实验室进行生物学研究^[1]。

秀丽隐杆线虫培养方法简单，可在固体也可在液体培养基中培养，但无论哪种培养条件，都以 OP50（尿嘧啶渗漏突变型大肠杆菌）喂食线虫。秀丽隐杆线虫可以进行冷冻保存，Sulston 等发现将线虫置于 30% 甘油中并保存在液氮条件下，线虫的保存时间可长达 25 年^[2]，这使带有各种遗传背景的虫株得以长期保存。

具有雄性和雌雄同体两种性别。自然生存的秀丽隐杆线虫雄性产生概率仅为千分之一，但可以通过热激等人为的方法增加雄虫的产生用于交配^[1]，雌雄同体一般自体受精，但有雄虫存在时，雌雄同体会优先选择雄性的精子。这极大地方便了遗传学研究。

秀丽隐杆线虫与人类有较多同源基因，与某些人类疾病具有相关性^[3]。基因组序列比对发现线虫与人类同源基因达到 40% 左右。进一步分析 Wormbase 中的

数据，发现秀丽隐杆线虫的药靶基因高达 60-80%与人类基因同源^[4]，因此对线虫的研究成果可以应用到更复杂的生物上。

从细胞学的角度来看，线虫既是一种多细胞的真核生物，又简单到可以被详细研究。秀丽隐杆线虫只有简单的系统分化，没有形成器官，细胞数目不多。Sulston 通过绘制秀丽隐杆线虫细胞谱系图^[5, 6]研究细胞的命运，线虫的每个体细胞（雌雄同体成虫 959 个，雄性成虫 1031 个）如何发育都有详细的纪录。秀丽隐杆线虫的每个体细胞的发育命运在个体之间差异不大，即每个细胞的发展命运几乎是确定的。

秀丽隐杆线虫 RNA 干扰方法简便。2006 年诺贝尔生理或医学奖颁发给 Fire 和 Mello，奖励他们对线虫 RNA 干扰技术^[7]的杰出贡献。RNA 干扰（RNA interference）技术给研究人员提供了研究线虫任何一个基因功能的方法，其基本机制是通过阻碍目的基因的翻译或转录来抑制基因表达。在植物和线虫中，与其它物种 RNAi 现象有所不同，RNAi 具有传递性，可在细胞之间传播。这使秀丽隐杆线虫的 RNAi 操作简便，通过喂食线虫表达了目的基因 dsRNA 的大肠杆菌，就可以实现基因沉默，此外还可以采用浸泡法和显微注射法。

综上所述，秀丽隐杆线虫作为生命科学领域的模式生物，以其显著优势曾经并依然在研究发育、遗传、分子甚至生理现象等不同领域上发挥着重大作用。

1.3 利用秀丽隐杆线虫研究的进化保守的参与寿命及应激调控信号通路

在自然环境中生活的生物，或多或少会面临环境压力，如饥饿、高温、渗透压变化等，而应激与寿命有很高的相关性。大量研究证实应激与衰老是通过某些信号通路控制的，并且这些通路在进化上高度保守。线虫中与应激、寿命调控相关的信号通路及关键蛋白主要有以下几方面。

1.3.1 胰岛素/胰岛素样生长因子信号通路（IIS）

胰岛素信号通路与很多动物乃至人体的寿命、耐受性、生长发育以及衰老等过程有关，其共同特征为胰岛素信号减弱、胰岛素敏感性增强以及血浆胰岛素样生长因子水平下降^[8]。在线虫体内，胰岛素信号通路对于生长发育、代谢和衰老的调节均起到关键性作用。在线虫中由于此过程涉及到 dauer 幼虫的形成，相关基因以 *daf*（dauer formation defective）命名。目前对秀丽隐杆线虫的 DAF-2 应激途径研究较为透彻，该途径在氧化应激和生长发育方面都发挥重要作用。

秀丽隐杆线虫中的 DAF-16 属于 FOXO 蛋白家族，也是胰岛素/胰岛素样生长因子信号通路中的关键调控因子。DAF-16 在应激抗性及其生长发育调节中发挥正调控作用，在线虫中高表达 DAF-16，其寿命显著延长^[9]，可见 *daf-16* 是重要的“长寿基因”。DAF-2 作为胰岛素受体同源物定位于线虫细胞膜上，是胰岛素受体家族在线虫中的惟一成员。研究^[10,11]显示，*daf-2* 通过 *age-1/akt-1/2* (serin/threonine protein kinase, Akt 激酶) 途径负调节 *daf-16*，从而抑制 DAF-16 进入细胞核激活相应基因的表达。在正常情况下，*daf-16* 活性处于较低水平，*daf-2* 突变可使 *daf-16* 被活化，使突变线虫寿命比野生型线虫长两倍多。可见 *daf-2* 的抑制或 *daf-16* 的激活是调节 IIS 从而延缓线虫衰老的关键部分。IIS 相关突变常伴随线虫对氧化应激、低氧、重金属、紫外和高温耐受性的增强^[12]。

线虫研究显示，在氧化应激和热应激条件下，DAF-16 会入核激活超氧化物歧化酶 SOD-3 以及热休克蛋白 Hsp-16.2^[13]等因子。SOD-3 可以清除体内过多的超氧化物和自由基，以减少氧化损伤。线虫还可以通过 DAF-2/DAF-16 信号通路与热休克因子 (heat shock factor, HSF-1) 之间的相互作用，调节抗氧化基因的表达如 *ctl-1* (catalase, 过氧化氢酶)、*ctl-2*、*sod-3* (superoxide dismutase, 超氧化物歧化酶) 等，分解活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS)，进而延长线虫的寿命^[14-16]。

1.3.2 MAPK 信号通路

目前在哺乳动物细胞中已发现五种 MAPK 信号转导通路，每种通路协调不同的细胞反应。例如 ERK1/2 信号转导通路调控细胞生长和分化，而 JNK 和 p38 MAPK 主要与应激调控密切相关，又名应激活化蛋白激酶 1 (stress-activated protein kinase 1, SAPK1)、应激活化蛋白激酶 2 (SAPK2)。p38 MAPK、ERK MAPK、JNK MAPK 信号通路从酵母到哺乳动物高度保守^[17]，三者分别与秀丽隐杆线虫中的 PMK-1 (MAPK 同源物)、MPK-1 (map kinase, ERK MAPK 同源物) 和 KGB-1 (Kinase GLH (germline helicase) -binding, JNK MAPK 同源物) 信号途径相对应。

JNK 信号转导通路：

JNK 会随着应激被激活的蛋白激酶，可以使 c-Jun 氨基末端活化区的 Ser63 和 Ser74 磷酸化，使其活化^[18]。JNK 的编码基因较多，而且每种基因的 mRNA

存在不同的剪接形式，产生了至少 10 种 JNK 分子。JNK 信号途径的关键激酶包括 MAPKK 类的 MKK4、MKK7 以及 MAPKKK 类的 MEKK1、2、3、4^[19]等。JNK 信号转导途径复杂多样，并与 ERK、p38 MAPK 等信号途径联系紧密。

p38 信号转导通路：

p38 蛋白激酶是相对分子质量为 38KD 的酪氨酸磷酸化蛋白激酶，是控制炎症反应最主要的 MAPK 家族成员之一。p38 信号通路的关键激酶有 MAPKK 类的 MKK3、MKK6 以及 MAPKKK 类的 TAK、ASK、NLK。在细胞因子、G 蛋白偶联受体、各种环境刺激（紫外线、热休克、渗透压休克等）等的作用下，p38 蛋白三肽基区的 Thr 和 Tyr 被双磷酸化而激活。p38 蛋白能够通过磷酸化激活 MAPK 活化蛋白激酶 2、3，进一步使小分子热休克蛋白（small heat shock protein, sHSP）^[20]磷酸化。

ERK 信号转导通路及 ERK5 信号转导通路：

ERK 信号转导通路是 MAPKs 蛋白家族中最早被认识、研究较为清楚的。ERK 蛋白是一种典型的调控增殖、转化和分化的 MAPKs^[21]。ERK 属与丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，部分类型的 ERK 被有丝分裂原激活后能转移到细胞核，发挥调控转录活性的功能^[22]。此外还有发现较晚的 ERK5 信号转导通路，目前已确定的 ERK5 上游激酶包括 MEK5、MEKK3。

秀丽隐杆线虫的 MAPK 途径与很多抗性表型相关。研究人员通过单核苷酸多态性（single nucleotide polymorphism）分析，发现与 ESP（enhanced susceptibility to pathogen）表型相关的突变基因对应于 MAPK 途径中的相关基因，如 *esp-2* 对应于 MAPK 途径中的 *sek-1*（SAPK/ERK kinase, MAPK 激酶），*esp-8* 对应于 *nsy-1*（neuronal symmetry, MAPK 激酶），可以介导秀丽隐杆线虫对病原菌的抗性作用^[23]。对 PMK-1 MAPK 途径中的 *sek-1* 突变分析发现，在金属镉存在条件下，其下游基因 *ttn-1*（toxin-regulated target of p38MAPK, 毒素调节基因）表达上调，而 *ttn-1* 编码一种与阳离子外流通道蛋白同源的蛋白，可能与重金属的抗性相关^[24]。几条 MAPK 途径之间联系紧密，如 PMK1 信号途径参与细菌感染的应激，而与重金属抗性相关的 KGB-1 及 JNK 途径中的 MEK-1 和 VHP-1 同时具有调节 PMK-1 活性的功能，表明 MEK-1 和 VHP-1 是两条信号途径的交叉点^[25, 26]。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库